

## Estudio de la dinámica de agregación proteica con TRP-cage

### *Study of protein aggregation dynamics with TRP-cage*

Recibido 20 Mayo 2018,  
Aceptado 11 Julio 2018

[www.unipaz.edu.co](http://www.unipaz.edu.co)

Cristian L. Faundez,<sup>a</sup> Ariel G. Meyra<sup>b</sup> y Gastón C. Ferrara<sup>†a,b</sup>

**Resumen:** Estudiamos mediante Dinámica Molecular (MD) la agregación de dos mini proteínas como el TRP-cage (TRP) en condiciones de pH neutro y con solvente explícito. Los resultados corresponden a dos sistemas diferentes, el primero con 3952 moléculas de agua en presencia de un TRP y el segundo con 7654 moléculas de agua y dos TRPs. Ambos sistemas fueron simulados en ensambles NVT y NPT a T=300 K y P=1 bar. Los resultados muestran la formación de dímeros estables en tiempos de simulación cortos. Los análisis hechos a partir de la superficie accesible al solvente muestran que el mecanismo principal o impulsor de la formación de estos dímeros a pH neutro es la interacción de tipo hidrofóbica entre distintos sectores de la proteína (aminoácidos hidrofóbicos). **Palabras claves:** Proteínas, TRP-cage, Superficie Accesible al Solvente (SASA).

**Abstract:** We studied by molecular dynamics (MD) aggregating two mini proteins such as TRP-cage (TRP) in neutral pH conditions and with explicit solvent. The results correspond to two different systems, the first with 3952 water molecules and one TRP and the second with 7654 water molecules and two TRPs. Both systems were simulated in NVT and NPT ensembles, with T = 300 K and P = 1 bar. The results show the formation of stable dimers in short simulation times. The analyzes made from the surface accessible to the solvent show that the main mechanism or driver of the formation of these dimers at neutral pH is the hydrophobic interaction between different sectors of the protein (hydrophobic amino acids). **Keywords:** Proteins, TRP-cage, Solvent Accessible Surface (SASA).

## INTRODUCCIÓN

El estudio del proceso de plegamiento proteico es de vital importancia para entender muchos de los eventos biológicos que ocurren en la célula. Así mismo, existen una serie de desórdenes conformacionales en la proteína ya plegada responsables en la aparición de patologías como la diabetes tipo 2, las cataratas, y desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, llegando incluso a ser mortales como es el caso de las encefalopatías espongiformes transmisibles *e.g.*, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Los mecanismos moleculares que desencadenan estas enfermedades son producto del *desorden de conformación proteico*

(DCP) y se han convertido en objeto de gran atención actualmente<sup>1-8</sup>.

Si solo tomamos como referencia la enfermedad de Parkinson, veríamos que su prevalencia es cercana al 2% en poblaciones mayores a 65 años, lo que transforma a esta enfermedad y al resto de los DCPs en un motivo de creciente preocupación para la población general.

Los mecanismos moleculares responsables de estos estados de agregación no han sido correctamente dilucidados, aunque es de consenso general que cuando las proteínas no se pliegan correctamente y, dependiendo de su entorno, o incluso aunque se plieguen correctamente pueden cambiar su conformación espontáneamente, produciéndose un estado de agregación proteica. Uno de los factores centrales que contribuye a la agregación son las interacciones moleculares entre las proteínas mal plegadas.

Dependiendo del entorno estos agregados pueden adoptar diversas formas que dan lugar a estructuras

<sup>a</sup>. Instituto de Ingeniería y Agronomía, Universidad Nacional Arturo Jauretche.

<sup>b</sup>. Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos, CONICET, Universidad Nacional de La Plata.

<sup>†</sup> [gferrara72@gmail.com](mailto:gferrara72@gmail.com)

mayores, siendo la más común la de tipo  $\beta$  amiloide. Este tipo de conformación le confiere a los agregados una gran resistencia ante mecanismos de degradación o desnaturalización, además de un carácter tóxico.

Los agregados proteicos asociados a las DCPs están conformados por proteínas que poseen un número importante de aminoácidos en su secuencia. Si tomamos como referencia la enfermedad de Parkinson, la proteína agregada es la  $\alpha$  sinucleína la cual se compone de 140 aminoácidos en su secuencia. Los tamaños proteicos y la carencia de estructura de algunas de las proteínas involucradas en los DCPs dificultan el estudio por medio de técnicas de simulación computacional. A fin de evitar grandes costos computacionales, hemos seleccionado como modelo de simulación la mini proteína Trp-cage, la cual es un excelente sistema para estudios de tipo experimental y teórico, encontrándose, además, ampliamente referenciada en estos campos. Esta proteína que está compuesta por una secuencia de 20 aminoácidos, tiene la propiedad de agregarse con facilidad cuando se desestabiliza su estructura, y por lo tanto consiste en un modelo adecuado para caracterizar la agregación y la formación de amiloides. Como condición extra se trata de una proteína de rápida cinética de plegamiento y gran estabilidad termodinámica<sup>9-11</sup>.

En este trabajo presentamos los resultados obtenidos para la dinámica de agregación de Trp-cage en condiciones de pH neutro. Se utilizó Dinámica Molecular (DM) como técnica central de simulación la cual nos permite obtener información sobre los mecanismos microscópicos subyacentes y la evolución temporal de la agregación de proteínas en solución. Observamos importantes cambios en el área accesible al solvente total de la proteína y en las distancias entre las regiones más hidrofóbicas (molécula de triptófano) cuando ocurren los estados de agregación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se estudia el comportamiento de proteínas (Trp-cage) en agua como solvente explícito. Las condiciones de las

cajas de simulación se indican en la Tabla 1, siendo A el sistema de control y B el sistema agregado.

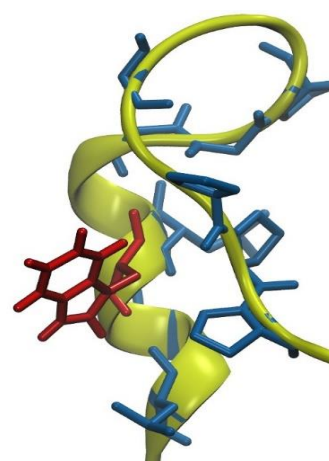
**Tabla 1.** Se indican en esta tabla los dos sistemas simulados y sus respectivas composiciones moleculares e iónicas.

Sistema	Número de Proteínas	Número de aguas	Número de iones de Cl <sup>-</sup>
A	1	3952	1
B	2	7654	2

La carga neta de la proteína Trp-cage no es nula, por lo que es necesario insertar 1 y 2 iones de cloro (Cl<sup>-</sup>) para lograr que los sistemas simulados se hallen en un equilibrio electrostático.

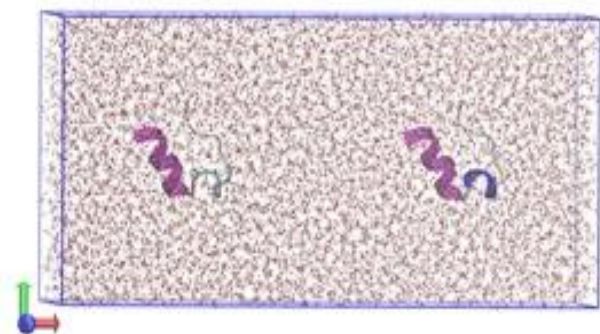
Esta proteína posee distintos tipos de estructuras secundarias, donde resalta una estructura de tipo  $\alpha$ -hélice y un núcleo hidrofóbico formado por la cadena lateral del residuo triptófano (Trp) entrecerrado por anillos compuestos de residuos de prolina (Pro). En el resto del esqueleto proteico (*backbone*) se pueden observar varios sectores de un comportamiento altamente hidrofóbico debido a la presencia de varios residuos de prolina (Pro) y leucina (Leu).

En la figura 1 representamos a la proteína en solución utilizada para el sistema de control A, donde han sido extraídas las moléculas de agua y cloro para facilitar la visualización de su estructura.



**Fig.1:** Estructura de la proteína TRP-cage. En amarillo se representa la cadena central, en azul los sectores hidrofílicos y en rojo se representa el *core* hidrofóbico compuesto por el triptófano.

En la figura 2 se muestra el sistema B completo en su condición inicial de simulación.



**Fig. 2:** Sistema B (Tabla I), compuesto por dos proteínas de Trp-cage en solución y dos moléculas de cloro (para mantener el sistema con carga nula), en su configuración inicial.

### Detalles de Simulación

Las trayectorias se obtuvieron usando como técnica central la Dinámica Molecular mediante el paquete de simulación GROMACS 2016<sup>12</sup> en dos tipos de ensamble NVT y NPT, siendo las dimensiones de las cajas de simulación A y B de  $X=5.23$ ,  $Y=4.92$ ,  $Z=4.28$  nm y  $X=10.63$ ,  $Y=4.92$ ,  $Z=4.28$  nm, respectivamente. Se utilizaron condiciones periódicas de contorno en todos los ejes y para todos los sistemas. En los dos casos se utilizó el modelo de agua *SPC/E*, el cual es un modelo rígido y de tres puntos<sup>13</sup>. La temperatura y la presión se controlaron con el termostato y baróstato de *Berendsen*<sup>14</sup>. El baño térmico se mantuvo en los dos sistemas alrededor de los  $300 \pm 2$  K. El baño de presión fue de 1 bar para el ensamble NPT.

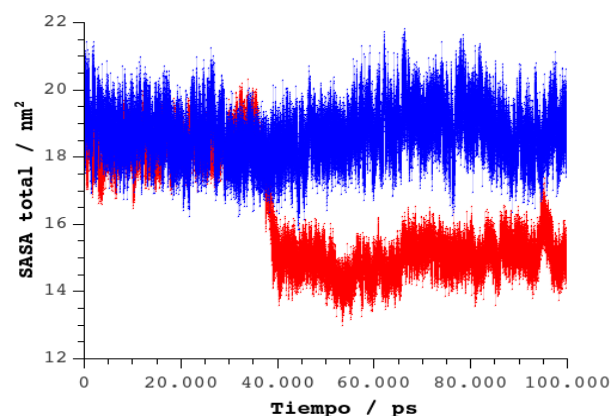
Las interacciones de largo alcance se calcularon utilizando *Reaction Field*<sup>15</sup>, con una constante dieléctrica de 78 y un radio de corte de 1.2 nm para todas las interacciones. El paso de integración utilizado durante las simulaciones fue de 2 fs. Durante los procesos de minimización, estabilización y simulación se utilizó el campo de fuerza *gromos54a7*<sup>16</sup>. El tiempo de simulación para ambos sistemas fue de 100 ns.

Con el fin de poder determinar los cambios que se producen en los estados de agregación de las proteínas para ambos ensambles, utilizamos una herramienta de análisis conocida dentro de la

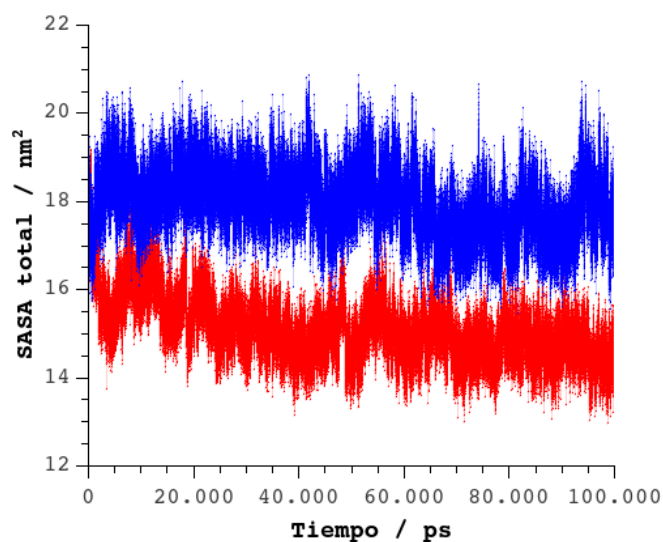
Dinámica Molecular como Superficie Accesible al Solvente (SASA). Básicamente este algoritmo funciona considerando una esfera rígida de iguales dimensiones al solvente la cual (*roller*) recorre la superficie de la proteína determinando su área.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las figuras 3 y 4 podemos observar el área accesible al solvente (SASA) para toda la proteína en los ensambles NVT y NPT respectivamente.



**Fig.3:** Superficie Accesible al Solvente (SASA) total por proteína vs tiempo para los sistemas A y B en ensamble NVT. Los triángulos azules corresponden al sistema A y los triángulos rojos al sistema B.



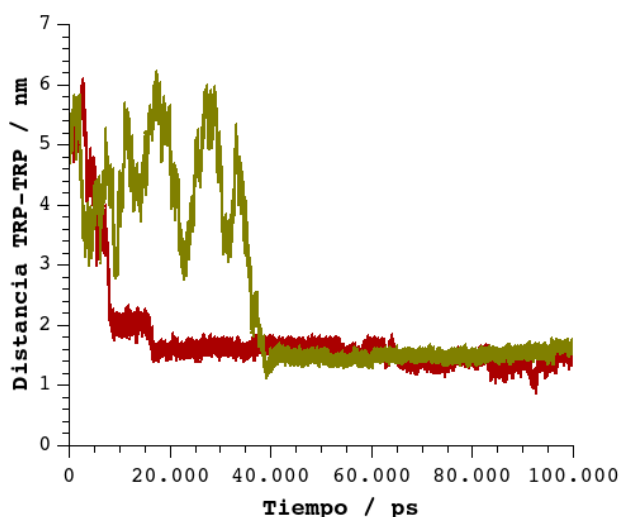
**Fig.4:** Superficie Accesible al Solvente (SASA) total por proteína vs tiempo para los sistemas A y B en ensamble NPT. Los triángulos azules corresponden al sistema A y los triángulos rojos al sistema B.

Es interesante observar en la figura 3 como el sistema de dos proteínas en un tiempo cercano a los 40 ns cambia drásticamente el área expuesta al

solvente, lo que parece estar asociado al cambio que se produce en el sistema cuando las dos proteínas se agregan, correspondiendo a un estado de menor energía.

Así, el área total accesible al solvente por proteína resulta menor que la que se observa para una proteína aislada a igual condición. Por su parte, en el ensamble NPT (Figura 4) no se observan cambios importantes o algún tipo de transición en las superficies accesibles al solvente, aunque el área por proteína es ligeramente menor cuando tenemos un sistema con dos proteínas que con uno y la monotonía del comportamiento es similar en ambos sistemas.

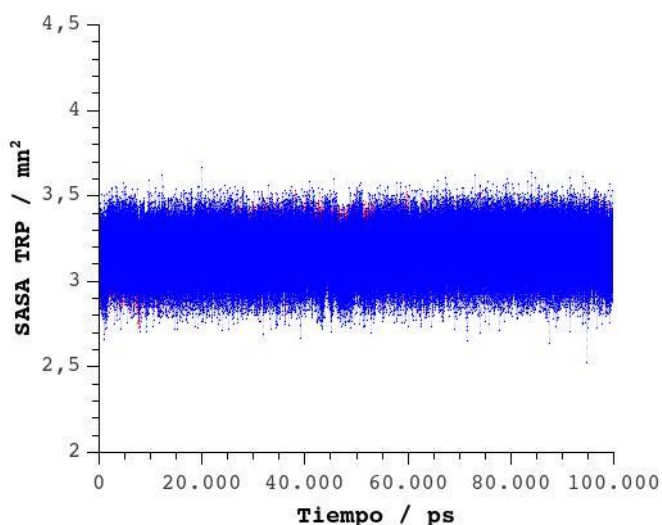
En la figura 5 se observa la distancia entre triptófanos durante la simulación para el sistema B en ambos ensambles.



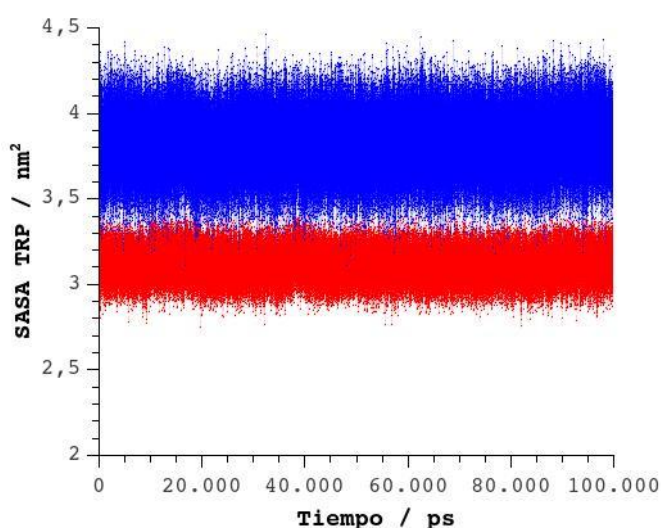
**Fig. 5:** Interdistancia entre TRP (triptófano) a lo largo de la dinámica para el sistema B para los ensambles NPT y NVT. Los triángulos marrones corresponden al ensamble NPT y los triángulos verdes al ensamble NVT.

La figura muestra claramente el cambio en las distancias entre triptófanos produciéndose la agregación en un tiempo cercano a los 40 ns para el sistema en el ensamble NVT con una mayor fluctuación. En el sistema con ensamble NPT la agregación entre ambas proteínas parece producirse muchos más rápido, ligeramente mayor a los 10 ns y con menor fluctuación. Ambos sistemas convergen a distancias similares entre triptófanos cuando se agregan.

Las figuras 6 y 7 muestran el área accesible al solvente para el triptófano de ambos sistemas y para cada ensamble.



**Fig. 6:** Superficie Accesible al Solvente (SASA) del triptófano por proteína vs tiempo para los sistemas A y B en ensamble NPT. Los triángulos rojos corresponden al sistema B y los triángulos azules al sistema A.



**Fig. 7:** Superficie Accesible al Solvente (SASA) del triptófano por proteína vs tiempo para los sistemas A y B en ensamble NVT. Los triángulos rojos corresponden al sistema B y los triángulos azules al sistema A.

La superficie accesible al solvente para el triptófano no se ve afectada (Figura 6) cuando el sistema se agrega en el ensamble NPT, el *core* hidrofóbico no parece experimentar cambios. Sin embargo en el ensamble NVT se observa un ligero cambio en la

superficie accesible al solvente para el triptófano, disminuyendo su área cuando se agrega.

El core hidrofóbico se ve claramente afectado por la agregación, siendo este comportamiento consistente con el observado para la superficie accesible total al solvente (Figura 4). Los cambios observados cuando se forman estos dímeros estables en el ensamble NVT parecen estar guiados principalmente por cambios en la hidrofobicidad del sistema. Más precisamente por los cambios que se producen en el agua del entorno ya que en este ensamble la presión es del orden de 2.2 Kbar.

## CONCLUSIONES

En este trabajo presentamos el estudio de la dinámica de agregación en diferentes condiciones termodinámicas (ensambles NVT y NPT) para sistemas a pH neutro de dos proteínas Trp-cage. Los resultados nos muestran que la dinámica de agregación en condiciones de presión constante es más rápida que a volumen constante, pero en ambos casos se forman dímeros estables. Además, de acuerdo a los resultados del SASA para la proteína y para el triptófano observamos que la proteína experimenta cambios en las regiones hidrofóbicas, acentuándose el efecto cuando la presión del sistema es mayor y hay una marcada pérdida en la estructura del agua (NVT). Estos resultados sugieren que la fuerza impulsora de la agregación de estas proteínas a pH neutro es centralmente de carácter hidrofóbico. Simulaciones con mayor número de moléculas de proteínas seguramente darán como resultado un agregado tipo micelar.

## AGRADECIMIENTOS

- Universidad Nacional Arturo Jauretche (UNAJ).
- Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB).
- Comisión de Investigaciones Científicas (CIC).

## REFERENCIAS

1. Koo, E. H., Lansbury, P. T., & Kelly, J. W. Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18), 9989-9990 (1999).
2. Hashimoto, M., Rockenstein, E., Crews, L., & Masliah, E.. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular medicine*, 4, 21-35 (2003).
3. Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., & Caughey, B. Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*, 308, 1435-1439 (2005).
4. Anne Stuenkel, Marcel Kunadt, Niels Kruse, Claudia Bartels, Wiebke Moebius, Karin M. Danzer, Brit Mollenhauer and Anja Schneider. Induction of  $\alpha$ -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain*, 139, 481-494 (2016).
5. Reinhard Klement, Timo Graen, Asaf Grupi, Elisha Haas and Helmut Grubmüller. Molecular Dynamics Simulations of Alpha-Synuclein Ensemble FRET Measurements from Different Force Fields. *Biophysical Journal*. 110, 551 (2016).
6. Takemoto, L., & Sorensen, C. M. Protein-protein interactions and lens transparency. *Experimental eye research*, 87(6), 496-501 (2008).
7. Wang, W., Nema, S., & Teagarden, D. (2010). Protein aggregation-Pathways and influencing factors. *International journal of pharmaceuticals*, 390, 89-99 (2010).
8. Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W., & Carpenter, J. F. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharmaceutical research*, 20, 1325-1336 (2003).



9. Sang Beom Kim, Devansh R. Gupta and Pablo G. Debenedetti. Computational investigation of dynamical transitions in Trp-cage miniprotein powders. *Scientific Reports* 6, Article number: 25612 (2016).
10. Soichiro Kitazawa, Martin J. Fossat, Scott A. McCallum, Angel E. Garcia and Catherine A. Royer. NMR and Computation Reveal a Pressure-Sensitive Folded Conformation of Trp-Cage. *J. Phys. Chem. B.* 121, 1258–1267 (2017).
11. Zhou, R. Trp-cage: folding free energy landscape in explicit water. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 13280-13285 (2003).
12. Hess, Berk and Kutzner, Carsten and Van Der Spoel, David and Lindahl, Erik. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.* 3, 435 (2008).
13. H. J. C. Berendsen, J. R. Grigera, and T. P. Straatsma, *The missing term in effective pair potentials*. *J. Phys. Chem.* 91, 6269 (1987).
14. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, A. DiNola, and J. R. Haak. *Molecular dynamics with coupling to an external bath*, *J. Chem. Phys.* 81, 3684 (1984).
15. I.G. Tironi, R. Sperb, P.E. Smith, W.F. van Gunsteren *J. Chem. Phys.* 102, 5451 (1995).
16. Nathan Schmid, Andreas P. Eichenberger, Alexandra Choutko, Sereina Riniker, Moritz Winger, Alan E. Mark and, Wilfred F. van Gunsteren. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7, *European biophysics journal*, 40, 843 (2011).